Über die Hemmung der Photosynthese bei Grünalgen nach Sauerstoffentzug

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Hedwig Michels
aus Trier

Mit 10 Abbildungen im Text

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1940

Über die Hemmung der Photosynthese bei Grünalgen nach Sauerstoffentzug

---

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
genehmigt von der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

von

Hedwig Michels
aus Trier

Mit 10 Abbildungen im Text

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 1939
Tag der Promotion: 15. Mai 1940.

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1940

Referenten: Professor Dr. Kurt Noack
Professor Dr. Ludwig Diels

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus „Zeitschrift für Botanik", 35. Band, Heft 7
Herausgegeben von Prof. Dr. Kurt Noack, Prof. Dr. Friedrich Oehlkers
u. Geh. Hofrat Prof. Dr. Friedrich Oltmanns
Verlag von Gustav Fischer in Jena

Seit den grundlegenden Untersuchungen von Willstätter und Stoll (1918) über die Assimilation der Kohlensäure grüner Pflanzen war die Ansicht verbreitet, daß zur Einleitung der Photosynthese die Mitwirkung von Sauerstoff notwendig sei; denn sie fanden, daß nach Sauerstoffentzug die Assimilation gehemmt ist. Dies führte zu einer von Willstätter (1933) aufgestellten Assimilationstheorie, nach welcher das Redoxsystem Chlorophyll $\rightleftharpoons$ Dehydrochlorophyll die Reduktion der Kohlensäure herbeiführt, wobei Sauerstoff zur Bildung des dehydrierten Chlorophylls notwendig sein soll.

Eine andere Vorstellung von der Rolle des Sauerstoffs bei der Photosynthese hat Kautsky (1937 und früher) entwickelt. Danach soll molekularer Sauerstoff bzw. eine peroxydartige Verbindung für die Übertragung der Lichtenergie auf die Assimilationskohlensäure unentbehrlich sein.

Gegen beide Vorstellungen wendet sich Gaffron (1935) auf Grund von Versuchen an Grünalgen, die zum Teil nach langdauerndem Sauerstoffentzug noch fast unverändert assimilieren konnten. In den Fällen, in denen eine Assimilationshemmung nach Anaerobiose auftrat, soll sie nicht durch den Sauerstoffmangel an sich, sondern durch Gärprodukte hervorgerufen sein, welche während der Anaerobiose entstehen und auf oxydativem Wege beseitigt werden können.

Andererseits konnte Emerson (1937) überhaupt keinen Einfluß des Sauerstoffentzugs auf die Photosynthese feststellen, wofern er nicht außerordentlich dichte Zellsuspensionen nahm, und führt die Befunde Gaffrons auf die Wirkung von Stoffwechselprodukten aus Begleitbakterien zurück. Auch Wassink und Mitarbeiter (1938) finden bei *Chlorella* unter Stickstoff in alkalischem Puffergemisch keine Assimilationshemmung; jedoch ist aus ihren Angaben nicht die Dauer der Anaerobiose vor der Photosynthese zu ersehen. Ebenso nimmt Stoll neuerdings (1936) unter Aufgabe seiner früheren Ansicht an, daß Sauerstoff zur Assimilation nicht nötig ist und daß diese bei Sauerstoffentzug lediglich infolge dadurch gestörter Respiration ausbleibt. Unmittelbare Belege bringt Stoll nicht bei, nimmt jedoch auf die Magnesiumabspaltung aus Chlorophyll in Pelargoniumblättern nach vierstündiger Anaerobiose Bezug und vermutet, daß schon vor der Magnesiumabspaltung nicht assimilierbare Säuren die Kohlensäure aus dem Ort der Photoreduktion verdrängen.

Die Unstimmigkeiten, die somit hinsichtlich der Bedeutung des Sauerstoffentzugs für die Photosynthese bzw. des Sauerstoffs für die Initialvorgänge der Photosynthese bestehen, konnten in der vorliegenden Arbeit behoben werden. Denn es zeigte sich, daß eine Hemmung der Photosynthese durch Sauerstoffentzug tatsächlich möglich ist, jedoch nur im sauren p_H-Bereich, so daß also freie Gärungssäuren, und zwar, wie sich in Übereinstimmung mit Gaffron ergab, erstaunlich leicht oxydable Gärungssäuren für die Hemmung der Photosynthese nach Anaerobiose verantwortlich zu machen sind.

Methoden.

Anzucht des Versuchsmaterials.

Chlorella pyrenoidosa. Eine Stammkultur von *Chlorella* erhielten wir aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der deutschen Universität in Prag. Diese Kultur wurde auf Agar weitergezüchtet und von da aus in Nährlösung eingeimpft. Von Zeit zu Zeit wurden die Kulturen auf glukosehaltigen Agar übertragen, um sie auf Bakterienfreiheit zu prüfen. Die absolute Reinheit des Materials war für die Untersuchungen sehr wesent-

lich. Die zur Anzucht und bei den Versuchen verwandte Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 0,01 n $Ca(NO_3)_2$; 0,01 n $MgSO_4$; 0,008 n NaH_2PO_4; 0,01 n KNO_3; $1 \cdot 10^{-4}$ n $FeCl_3$; $1 \cdot 10^{-6}$ n $MnCl_2$. Diese Lösung diente auch mit 1,5% Agar für die fortlaufende Stammkultur.

Für die Untersuchungen wurden die Algen in 250-ccm-Erlenmeyerkolben im kontinuierlichen Licht einer Beleuchtungsanlage herangezogen, deren Lampen mit fließendem Wasser gekühlt waren. Sterile Luft mit ca. 5% Kohlensäure durchströmte nach sorgfältiger Reinigung dauernd die Kulturen, womit eine genügende Kohlensäureversorgung gewährleistet und ein Absitzen der Zellen verhindert wurde[1].

Vor dem Beimpfen aus dem Agarröhrchen wurde die Nährlösung in den Kulturkolben sterilisiert. Die Zellsuspensionen wurden nach ein- bis zweiwöchiger Kultur zu den Versuchen verwendet.

Scenedesmus obliquus. Der *Scenedesmus*-Stamm wurde im hiesigen Institut von Herrn Dr. Pirson isoliert. Er wurde in derselben Weise wie *Chlorella* steril auf Agar kultiviert und von da aus in flüssige Nährlösung eingeimpft. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: 0,01% $Ca(NO_3)_2$; 0,001% K_2HPO_4; 0,001% $MgSO_4$; 0,00001% $FeSO_4$; dazu kam so viel Erdabkochung, daß die Lösung schwach gelblich gefärbt wurde. Die Anzucht erfolgte steril in 250 ccm Erlenmeyerkolben, die mit Wattepfropfen gut verschlossen waren. Da sich der *Scenedesmus*-Stamm zur Kultur bei kontinuierlicher, starker Beleuchtung nicht eignet, wurden die Anzuchten im Tageslicht eines hellen und kühlen Gewächshauses vorgenommen. Die schwach alkalische Reaktion der Nährlösung begünstigt die Kohlensäureversorgung, so daß ein tägliches Schütteln das Einleiten von Luftkohlensäuregemisch voll ersetzte. Nach 3 Wochen hatten die Kulturen eine tiefgrüne Farbe und waren für die Versuche verwendbar.

Ausführung der Versuche. Die Gaswechselmessungen wurden nach der manometrischen Methode von

[1]) Eine Beschreibung der Anlage befindet sich bei A. Pirson, Ernährung der Pflanze. 1940. **36**, 25.

Warburg vorgenommen. Der Thermostat war mit einer elektrisch betriebenen Rühranlage und Schüttelvorrichtung versehen. Die Temperatur wurde durch ein Kontaktthermometer auf 25° konstant gehalten. Die Manometergefäße hatten Kastenform und eine Ansatzretorte zur Zugabe von Lösungen oder Salzen im Verlauf der Versuche. Das Volumen der Versuchsflüssigkeit betrug stets 5 ccm. Die Messungen wurden entweder in schwach saurer Kulturlösung ($p_H = 4{,}0$) oder im alkalischen Karbonat-Bikarbonat-Puffer nach Warburg ($p_H = 9{,}2$) durchgeführt. Dieser enthielt 85 Teile einer $^1/_{10}$ molaren $NaHCO_3$-Lösung + 15 Teile $^1/_{10}$ molarer Na_2CO_3-Lösung. In besonderen Fällen wurden auch Untersuchungen in anderen Lösungen ausgeführt.

Für Assimilationsversuche in saurer Kulturlösung wurde ein Gemisch von Luft mit 5% Kohlendioxyd aus einer Stahlflasche in die Manometergefäße eingeleitet. Die Bedingungen der Anaerobiose wurden durch Beschickung der Gefäße mit Stickstoff hergestellt, der über glühendem Kupfer von Sauerstoff befreit war. Sollte nach Anaerobiose die Assimilation weiter untersucht werden, so wurde der Stickstoff zusammen mit Kohlendioxyd über glühendes Kupfer geleitet. Ebenso wurde bei Luftzufuhr nach Anaerobiose 5% Kohlendioxyd beigemischt. Bei Versuchen mit Karbonat-Bikarbonat-Puffer unterblieb natürlich der Kohlendioxydzusatz. — Die Belichtung der Manometergefäße erfolgte durch eine in den Thermostaten versenkbare, gekühlte Soffittenlampe.

Berechnung der Versuchsergebnisse. Im allgemeinen wurden die manometrisch gewonnenen Meßergebnisse in Kubikmillimeter Sauerstoff bzw. Kohlendioxyd umgerechnet. Zur Berechnung wurden die von Warburg aufgestellten Formeln verwendet. Dabei war natürlich bei der Verwendung saurer Kulturlösung die Formel für das Verschwinden des einen und Entstehen des anderen Gases, bei Versuchen in Karbonat-Bikarbonat-Puffer und in Bikarbonatlösung die Formel für das Entstehen eines Gases anzuwenden. In einigen Fällen erübrigte sich die Umrechnung; die Druckänderungen wurden dann in Zentimeter Brodie-Lösung angegeben.

I. Bedeutung des p_H-Wertes für das Auftreten einer Assimilationshemmung nach Anaerobiose.

Wie bereits erwähnt, hielt Gaffron (1935) Gärprodukte, die während der Anaerobiose von den Algen gebildet werden, für die Ursache der Assimilationshemmung nach Sauerstoffentzug. Er wies (1939), wie schon Genevois (1937), als Gärprodukte außer Kohlensäure und Alkohol auch fixe Säuren nach, die er für die Assimilationshemmung nach Anaerobiose verantwortlich machte.

Somit liegt der Gedanke nahe, daß der schädliche Einfluß der Gärprodukte auf den Assimilationsapparat von der H-Ionenkonzentration des Versuchsmediums beeinflußt werden kann.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden *Chlorella* bzw. *Scenedesmus*-Suspensionen in schwach saurer Nährlösung (p_H-Wert = 4,0) und gleichzeitig in Karbonat-Bikarbonat-Puffer (p_H-Wert = 9,2) angesetzt; die saure und alkalische Suspension wurde jeweils vergleichsweise hinsichtlich ihres Verhaltens bei Sauerstoffentzug und nachfolgender Belichtung geprüft. Die Bedingungen der Anaerobiose wurden in der sauren Lösung durch Einleiten von reinstem Stickstoff-Kohlensäure-Gemisch, in der alkalischen Pufferlösung durch Stickstoff allein, hergestellt. Der Versuch, bei dem die Algen im Thermostaten bei 25° dauernd geschüttelt wurden, gliedert sich in zwei Teile: eine vielstündige Periode des Sauerstoffentzugs im Dunkeln und daran anschließend eine Hellperiode, welche die Wirkung der vorhergehenden Anaerobiose auf die Photosynthese aufklären sollte.

Aus Tab. 1 und 2 geht klar und für beide Algen in übereinstimmender Weise hervor, daß eine Assimilationshemmung im alkalischen Puffer-Gemisch nicht eintritt, während die Anaerobiose in saurer Lösung eine andauernde Hemmung der Photosynthese zur Folge hat; lediglich ein kurzer und schwacher Druckanstieg wird in den meisten Fällen im Anschluß an die Belichtung beobachtet. Dieser Befund wurde an Algen bei verschiedener Kulturdauer und Lichtstärke während der Anzucht immer wieder erhalten. Zu bemerken ist jedoch, daß zur völligen Assimilationshemmung in saurer Lösung bei Kulturen von verschiedener physiologischer Einstellung auch eine recht ver-

Tabelle 1.

Vergleich der Assimilation von *Chlorella* in Karbonat-Bikarbonat-Gemisch und in saurer Kulturlösung nach Anaerobiose. *Chlorella* ist suspendiert:

a) in Karbonat-Bikarbonat-Lösung (p_H-Wert = 9,2),
b) in Kulturlösung (p_H-Wert = 4,0).
Temperatur: 25°; Gas: a) Stickstoff; b) Stickstoff + CO_2.

Zeit	13 Std. anaerob im Dunkeln	0—45 Min.	45—75 Min.	75—115 Min.	115—145 Min.
		anaerob im Licht			
		cmm Sauerstoff			
a)	+ 0,05 cm Brodie	10,15	9,95	14,40	10,00
a)	0 ,, ,,	10,40	10,25	14,60	10,35
b)	1,43 cmm CO_2	0,26	0	0	0
b)	1,32 ,, ,,	0,66	0,06	0	0,06

Tabelle 2.

Vergleich der Assimilation von *Scenedesmus* in Karbonat-Bikarbonat-Gemisch und Kulturlösung nach Anaerobiose. *Scenedesmus* ist suspendiert:

a) in Karbonat-Bikarbonat-Lösung (p_H-Wert = 9,2),
b) in Kulturlösung (p_H-Wert = 4,0).
Temperatur: 25°; Gas: a) Stickstoff; b) Stickstoff + CO_2.

Zeit	21 Std. anaerob im Dunkeln	0—15 Min.	15—30 Min.	30—55 Min.	55—95 Min.	95—145 Min.	145—220 Min.
		anaerob im Licht					
		cm Brodie					
a)	+ 0,60	+ 1,20	+ 2,30	+ 3,05	+ 6,90	+ 8,90	+ 13,40
a)	+ 0,75	+ 1,20	+ 2,00	+ 3,75	+ 6,85	+ 8,85	+ 13,50
b)	+ 0,15	— 0,05	0	— 0,05	+ 0,05	0	— 0,05
b)	0	+ 0,10	0	0	0	+ 0,05	— 0,05
b)	0	0	0	— 0,05	+ 1,10	0	0

schiedene Dauer des Sauerstoffentzugs notwendig war. Im allgemeinen war eine Dunkelperiode von 12—17 Std. erforderlich. Aber selbst nach 17stündigem Sauerstoffentzug kam es gelegentlich vor, daß die Photosynthese bei Belichtung wieder einsetzte. Dies erfolgte dann in der Weise, wie es schon Gaffron (1935) ausführlich beschrieben hat. Der Verlauf der Druckänderung in den ersten Minuten nach Belichtung wurde von uns nicht in die Untersuchung einbezogen. Gaffron beobachtete in dieser Zeit nach einem ersten scharfen Anstieg eine vorübergehende Druckabnahme, die ihn zu der Vorstellung führte, daß assimi-

lationshemmende Gärprodukte mit Hilfe des entwickelten Sauerstoffs auf oxydativem Wege beseitigt werden.

Ob auch nach Anaerobiose in alkalischem Puffer-Gemisch durch Verbrauch des anfänglich gebildeten Assimilationssauerstoffs zur Oxydation von Gärprodukten die Photosynthese zunächst scheinbar sistiert war, wie Gaffron (S. 343) beschreibt, konnten wir nicht entscheiden. Es sei aber nochmals ausdrücklich betont, daß bei genügend langem Sauerstoffentzug die Photosynthese in saurer Lösung völlig gehemmt, in alkalischer Lösung dagegen in keinem einzigen Versuch stillgelegt war.

Dieser Unterschied in der Wirkung des Sauerstoffentzugs auf die Kohlensäureassimilation kann in zweierlei Weise erklärt werden. Entweder entstehen bei alkalischer Reaktion überhaupt keine assimilationshemmenden Gärprodukte oder ihre schädigende Wirkung wird durch Neutralisation aufgehoben. Eine Entscheidung konnte nicht getroffen werden. Immerhin ist zu bemerken, daß die Assimilationshemmung infolge Anaerobiose in saurer Lösung aufgehoben werden kann, wenn vor der Belichtung durch Zusatz von Karbonat-Bikarbonat-Gemisch eine Alkalisierung des Mediums stattfindet.

Ein entsprechender Versuch ist in Abb. 1 für *Chlorella* und in Tab. 3 für *Scenedesmus* wiedergegeben. Nach 11—18stündiger Anaerobiose unter Stickstoff wurde in die saure Lösung aus der Ansatzretorte Karbonat und Bikarbonat in einer dem Puffergemisch entsprechenden Menge übergeführt und im Anschluß daran das Licht eingeschaltet. Die Assimilation beginnt sogleich, während ein Kontrollversuch ohne Alkalizusatz eine Hemmung der Photosynthese zeigte. Wir sehen daraus, daß in der Tat assimilationshemmende Gärprodukte von saurem Charakter entstehen und durch Neutralisation beseitigt werden, ferner, daß die durch sie verursachte Hemmung der Assimilation vollkommen reversibel ist.

Wird die Neutralisation der sauren Nährlösung erst nach längerer (z. B. einstündiger) Belichtung der anaerob gehaltenen Zellsuspensionen durchgeführt, so kann die Fähigkeit zur Photosynthese nicht mehr hergestellt werden, offenbar deswegen, weil die Belichtung des unter der Wirkung von Gärprodukten außer Funktion gesetzten Assimilationsapparates zu irreversiblen Schä-

digungen führt, wobei auch an photodynamische Schädigung gedacht werden kann [Noack (1925)].

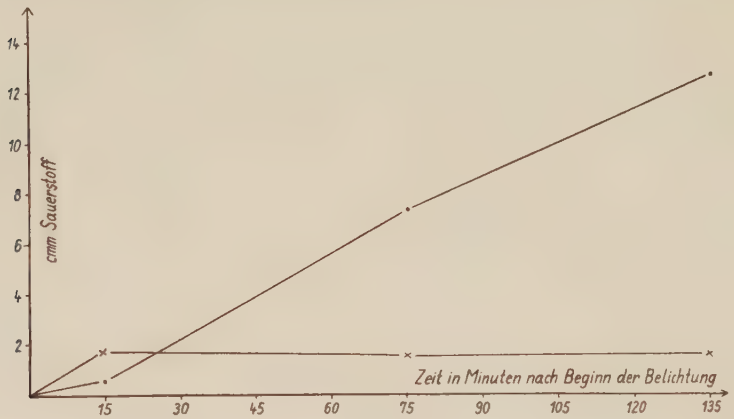

Abb. 1. Assimilation von *Chlorella* nach anaerober Dunkelperiode in saurer Kulturlösung (p_H-Wert = 4,0):
a) in kurz vor Beginn der Belichtung durch Zusetzen von $NaHCO_3$ und Na_2CO_3 aus der Ansatzretorte alkalisierter Suspension •——•,
b) in saurer Suspension ×——×.
Temperatur: 25°; Gas: a) Stickstoff; b) Stickstoff + CO_2.

Tabelle 3.
Assimilation von *Scenedesmus* nach anaerober Dunkelperiode in saurer Kulturlösung (p_H-Wert = 4,0).
a) in kurz vor Beginn der Belichtung durch Zusetzen von $NaHCO_3$ und Na_2CO_3 aus der Ansatzretorte alkalisch gemachter Suspension,
b) in saurer Suspension.
Temperatur: 25°; Gas: a) Stickstoff; b) Stickstoff + CO_2.

Zeit	17 Std. anaerob im Dunkeln	0—15 Min.	15—30 Min.	30—75 Min.
		anaerob im Licht cmm Sauerstoff		
a)	0,73 cmm CO_2	1,66	0,55	4,70
a)	1,15 „ „	0,58	0,88	3,80
b)	1,43 „ „	0	0	0
b)	1,43 „ „	0	0	— 0,06

II. Beseitigung der Assimilationshemmung durch Luftsauerstoff.

Die Neutralisation bildet jedoch nicht die einzige Möglichkeit, die Gärprodukte zu beseitigen. Auch nach Einleiten eines kräf-

tigen Luftstroms in die Manometergefäße im Anschluß an die Periode des Sauerstoffentzugs, beginnen die Algen in saurer Kulturlösung wieder zu assimilieren. Daraus geht erneut hervor, daß hier also nur eine Hemmung, nicht aber eine dauernde Schädigung der Photosynthese vorliegt.

Nach langer Anaerobiose folgte auf das Einleiten von Luft ein überaus starker Sauerstoffverbrauch. Diese schon von Gaffron (1935) beobachtete Erscheinung wird von diesem auf die Oxydation von Gärprodukten zurückgeführt. Auf Grund der in Abschnitt I mitgeteilten Tatsache handelt es sich dabei um saure Gärprodukte. Daß es sich tatsächlich um eine oxydative Zerstörung dieser Produkte handelt, wird im folgenden an Hand der Versuche mit Chinon direkt bewiesen.

Der Sauerstoffverbrauch ist zunächst größer als die Assimilation, d. h. es wird mehr Sauerstoff verbraucht als durch die Photosynthese entsteht.

Abb. 2 zeigt bei *Chlorella* nach Anaerobiose in saurer Lösung Ausbleiben der Assimilation. Nach Einleiten von Luft beginnt jedoch die Photosynthese. In anderen Versuchen war die Kurve zunächst flach und wurde dann steiler. Dieser Verlauf muß dadurch erklärt werden, daß nach dem Luftzutritt ein Teil des

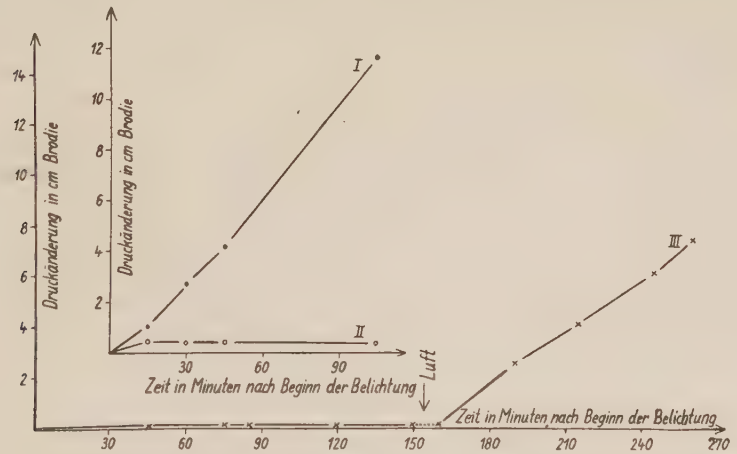

Abb. 2. Vergleich der Assimilation von *Chlorella* nach 12stünd. Dunkelperiode in Luft und in Stickstoff. *Chlorella* ist in Kulturlösung suspendiert. Gas: I Luft + CO_2; II Stickstoff + CO_2; III Stickstoff + CO_2, dann Luft + CO_2; Temperatur: 25°.

Assimilationssauerstoffs zur Beseitigung der Gärprodukte verbraucht wird. Beim Fortschreiten der Oxydation sinkt der Sauerstoffbedarf, so daß die wahre Assimilation in zunehmendem Maße zum Ausdruck kommt. *Scenedesmus* verhielt sich ebenso.

Wie früher erwähnt, kann nach lange andauernder Anaerobiose das Wiedereinsetzen der Photosynthese bei Alkalizusatz ausbleiben. Dies kann auch bei Ersatz des Alkali durch Sauerstoff der Fall sein, jedoch mit der Besonderheit, daß meistens der Alkalizusatz die Hemmung der Photosynthese noch während eines Zustands der Zellen beseitigt, in dem sie durch Luftzutritt nicht mehr wieder zur Photosynthese gebracht werden können. Dies dürfte auf einer irgendwie gearteten Stabilisierung der Gärungsprodukte beruhen, die ihre anfänglich merkwürdig starke Empfindlichkeit gegen Oxydation aufhebt, ohne ihre Giftigkeit zu beeinträchtigen.

III. Beseitigung der Assimilationshemmung durch Wasserstoffakzeptoren.

Es wurde der Versuch gemacht, die Assimilationshemmung infolge lang dauernden Sauerstoffentzugs mit Hilfe bekannter Wasserstoffakzeptoren wie Chinon, Methylenblau und rotem Blutlaugensalz durch Dehydrieren der schädigenden Stoffe zu beseitigen.

A. Versuche mit Chinon.

a) In Luft. In Vorversuchen wurde geprüft, welche Chinonkonzentrationen von *Chlorella* ertragen werden. Wir ließen verschieden starke Lösungen zwischen $^1/_{500}$ und $^1/_{12\,000}$ mol in Luft auf die Algen einwirken. Bei dem in Abb. 3 dargestellten Versuch wurde zu Beginn der Assimilationsmessung Chinonlösung aus der Ansatzretorte der Manometergefäße in die Algensuspension in Nährlösung übergeführt. Die Konzentration der wässerigen Chinonlösung war so bemessen, daß 0,25 ccm in der Ansatzretorte die gesamte im Hauptraum befindliche Suspension auf die gewünschte Chinonkonzentration bringen konnte.

Eine $^1/_{500}$ molare Chinonlösung führt in Luft in 30 Minuten zum Erlöschen der Assimilationstätigkeit; eine $^1/_{1000}$ molare

Lösung führt eine sehr starke Schädigung der Photosynthese herbei, bringt sie aber nicht vollständig zum Erlöschen. Auch $^1/_{4000}$ molare Lösung verursacht noch eine erhebliche Hemmung, während bei $^1/_{8000}$ molarer Chinonlösung nach kurzer Schwächung die Assimilation sich erholt und in $^1/_{12\,000}$ mol fast normal ist.

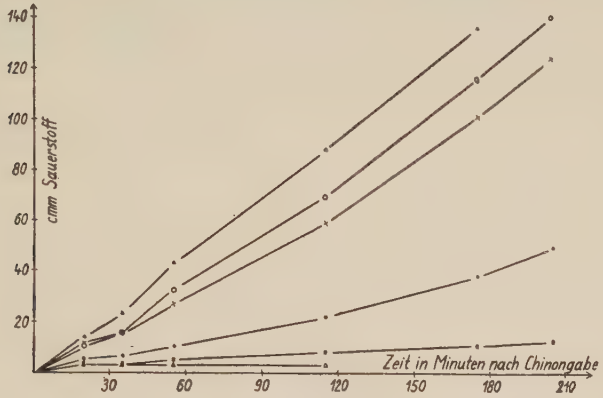

Abb. 3. Wirkung verschiedener Chinonkonzentrationen auf die Assimilation von *Chlorella*. *Chlorella* ist suspendiert in Kulturlösung. Bei Zeit = o Min. wurde die Chinonlösung zugegeben.

Temperatur: 25°; Gas: Luft + CO_2 ▲—▲ ohne, o—o m/12 000, ×—× m/8000, •—• m/4000, ■—■ m/1000, △—△ m/500 Chinon.

b) In Stickstoff. Wir prüften nun die Chinonwirkung auf die Assimilation nach längerer Anaerobiose in Kulturlösung. Chlorellen wurden 10—17 Std., d. h. so lange im Dunkeln geschüttelt, bis bei Belichtung die Assimilation ausblieb. Nach dem Einschalten des Lichtes wurde meist ein kurzer Assimilationsstoß beobachtet [vgl. auch Gaffron (1935) und neuerdings auch Blinks und Skow (1938)], dann blieb die weitere Assimilation aus und trat erst nach Chinonzusatz ein. Im Gegensatz zum Wiederingangsetzen der Photosynthese durch Sauerstoffzufuhr (Parallelversuch) war hier, und zwar bei Anwendung hoher und niederer Chinonkonzentrationen, die wiedereinsetzende Photosynthese sofort als Druckanstieg nachweisbar. Dies beruht natürlich darauf, daß der Assimilationsgaswechsel nicht durch einen Oxydationsgaswechsel, wie dies bei der Sauerstoffzufuhr der Fall ist, in merklichem Maße anfänglich verdeckt wird. Das

Chinon oxydiert demnach wohl rascher als Sauerstoff die giftigen Gärprodukte (Abb. 4).

Interessant ist es dabei, daß auch solche Chinonkonzentrationen die Assimilation in Gang bringen, welche sich in Luft als stark schädlich erwiesen haben (Abb. 5). Gerade die höheren Konzentrationen beseitigen die Assimilationshemmung am besten. Allerdings macht sich in zeitlich zunehmendem Maße eine Schädigung bemerkbar (bei $^1/_{500}$ molarer Chinonlösung etwa

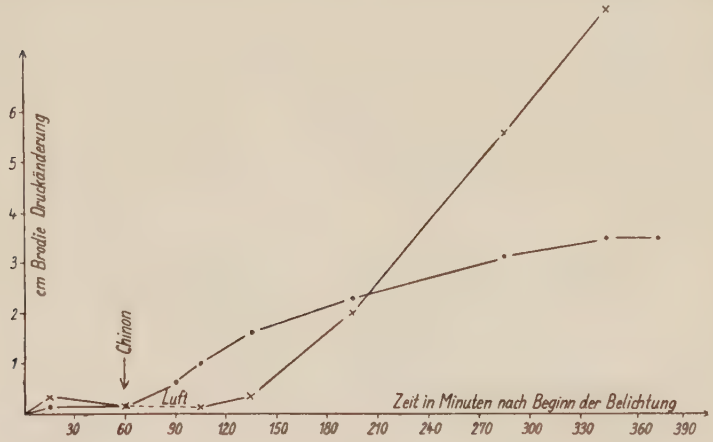

Abb. 4. Vergleich der Wirkung von Chinon und Luft auf die Assimilation von *Chlorella* nach 14stünd. anaerober Dunkelperiode. *Chlorella* ist in Kulturlösung suspendiert. Bei Zeit = 60 Min. wird in •——• mol/500 Chinon aus der Ansatzretorte in die Algensuspension übergeführt, in ×——× von 60—105 Minuten Luft eingeleitet.
Temperatur: 25°; Gas: Stickstoff + CO_2.

60 Minuten nach Zugabe). Bei $^1/_{10\,000}$ mol Chinon ist andererseits die Assimilation gering, weil diese Menge offenbar zur völligen Entgiftung der Gärprodukte nicht ausreicht; sie hält dafür aber mehrere Stunden lang in der Wirkung an. Daß in $^1/_{10\,000}$ mol Chinonlösung eine Schädigung durch Chinon kaum vorhanden war, geht auch daraus hervor, daß sich bei nachträglicher Luftzufuhr die Photosynthese rasch erholte, während z. B. in dem entsprechenden Versuch mit $^1/_{500}$ molarer Lösung die Assimilation bei nachträglicher Luftzufuhr nicht wieder begann, wenn sie etwa 1 Std. nach Chinonzusatz wieder zum Stillstand gekommen war. Aufhebung der Assimilationshemmung und

Schädigung der Zellen durch das Chinon zeigen also eine entgegengesetzte Konzentrationsabhängigkeit, welche die Möglichkeit ausschließt, die Assimilation nach Anaerobiose für dauernd auf den Normalwert zurückzubringen. Dies ist jedoch für die hier vorliegenden Fragen ohne Belang.

Den Nachweis, daß bei Chinonzusatz nach Anaerobiose Sauerstoff durch Assimilation gebildet wird, brachte ein Versuch mit gelbem Phosphor als Sauerstoffabsorptionsmittel. Für den Ver-

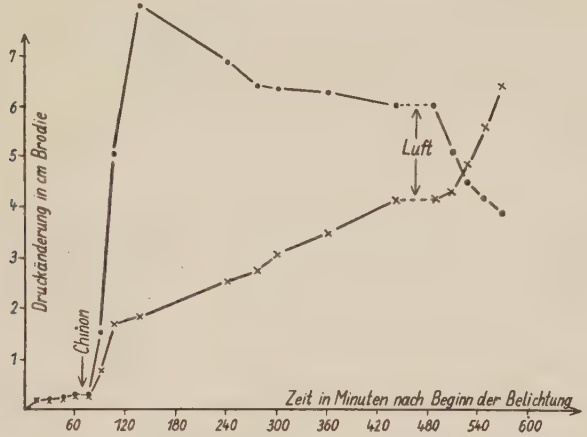

Abb. 5. Vergleich der Wirkung von 1/500 und 1/10 000 molarer Chinonlösung auf die Assimilation von *Chlorella* nach anaerober Dunkelperiode. *Chlorella* ist in Kulturlösung suspendiert. Im Anhang der Gefäße befindet sich Chinon in Wasser gelöst, das 75 Min. nach Beginn der Belichtung in die Algensuspension übergeführt wird.

Temperatur: 25°; Gas: Stickstoff + CO_2 ·——· m/500 Chinon, ×——× m/10 000 Chinon.

such wurde ein von Gaffron (1935) beschriebenes Manometergefäß verwendet, welches erlaubt, das Absorptionsmittel von dem eigentlichen Versuchsraum gasdicht zu trennen und erst zu einem gewünschten Zeitpunkt mit dem zu absorbierenden Gas ohne Unterbrechung des Versuchs in Verbindung zu bringen. Die Messung gibt Abb. 6 wieder: Nach einer Anaerobiose im Dunkeln unter Stickstoffkohlensäuregemisch wurde das Licht eingeschaltet. Eine Assimilation erfolgte zunächst nicht. Erst von dem Augenblick an, wo m/500 Chinon zugegeben wurde, fand eine Druckentwicklung statt, die nach einiger Zeit infolge

Schädigung durch das Chinon erlosch. In diesem Zeitpunkt wurde der Phosphor mit dem Hauptraum in Verbindung gebracht. Im ersten Augenblick, nachdem die beiden Gasräume

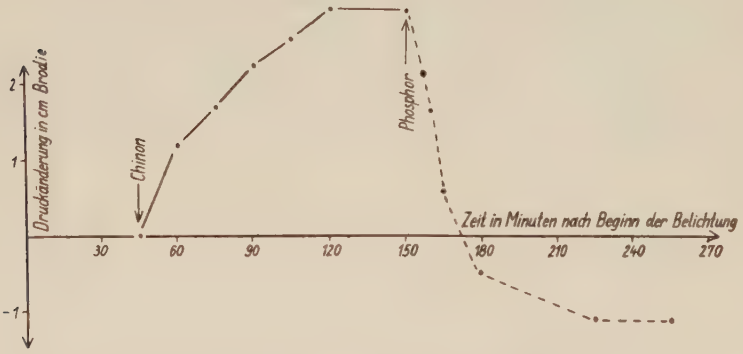

Abb. 6. Nachweis der Sauerstoffbildung nach Zusatz von m/500 Chinon beim Belichten von *Chlorella* nach anaerober Dunkelperiode mit Hilfe von gelbem Phosphor. *Chlorella* ist in Kulturlösung suspendiert. Im Anhang befindet sich in Wasser gelöst Chinon, das nach 45 Min. Belichtungszeit in die Algensuspension übergeführt wird. Nach 150 Min. wird die Ansatzretorte mit Phosphor mit dem Hauptraum in Verbindung gebracht.
Temperatur: 25°; Gas: Stickstoff + CO_2.

kommunizierten, leuchtete der Phosphor auf, dann ging der gesamte nach Chinongabe entstandene Druck zurück und ging sogar in Unterdruck über.

Erst aus diesen Befunden können wir mit Sicherheit entnehmen, daß in Gegenwart von Chinon tatsächlich Sauerstoff gebildet wird. Daß es sich um Assimilationssauerstoff handelt, geht aus Kontrollversuchen hervor, in denen Chinonzusatz zu reiner Nährlösung oder zu toten *Chlorella*-Zellen (getrocknet bei Zimmertemperatur) keine Gasentwicklung zur Folge hatte. Der angeführte Nachweis von Assimilationssauerstoff kann nur qualitativ sein, denn es ist damit zu rechnen, daß ein Teil des unter der Chinonwirkung frei werdenden Assimilationssauerstoffs sich an der oxydativen Beseitigung der Gärprodukte beteiligt. Es würde dann vorübergehend der Assimilationsquotient kleiner als Eins sein und ein physiologischer Zustand hergestellt, der, wenn auch wohl nur formal, der normalen Assimilation der Purpurbakterien ähnelt.

B. Versuche mit Methylenblau.

a) In Luft. Zunächst wurde, wie bei Chinon, in Reihenversuchen die Wirkung verschiedener Methylenblaumengen auf die Assimilation von *Chlorella* in Luft untersucht. Es wurden Methylenblaukonzentrationen von 0,004—0,00004% angewandt. Um auch hier den Einfluß des Methylenblaus vom ersten Augenblick an verfolgen zu können, wurde der Farbstoff in Wasser gelöst in den Ansatz der Versuchsgefäße gebracht und erst nach kurzer Assimilation in den Hauptraum gekippt. Eine Konzentration von 0,004% hemmt zwar die Assimilation, bringt sie jedoch nicht zum Erlöschen. 0,002% schädigen bereits erheblich weniger, bei 0,0004 und 0,0002% ist nur eine geringe Assimilationshemmung zu verzeichnen, 0,00004% Methylenblau beeinflussen die Assimilation nicht mehr.

b) In Stickstoff. Die in Kulturlösung suspendierten Chlorellen wurden so lange im Dunkeln in Anaerobiose geschüttelt, bis bei nachfolgender Belichtung die Assimilation ausblieb. Dann wurde Methylenblau in den Konzentrationen 0,004 und 0,002% zugegeben und in eine Kontrolle ohne Methylenblau Luft eingeleitet. In den Gefäßen mit Methylenblau wurde keine Assimilation beobachtet, während die Kontrolle, in die nach der Anaerobiose Luft eingeleitet wurde, sofort zu assimilieren begann. Die Algen in Methylenblau zeigten nach Luftzufuhr ebenfalls Assimilation. Methylenblau regt also die Assimilation nach Anaerobiose nicht an.

C. Versuche mit rotem Blutlaugensalz.

Dieses Salz wurde in Anbetracht des hohen Normalpotentials im System $FeCN_6^{---}/FeCN_6^{----}$ geprüft, obwohl natürlich seine Reaktionsgeschwindigkeit mit den in Frage kommenden Systemen der *Chlorella*-Kulturen nicht bekannt ist.

a) In Luft. In saurer Kulturlösung wurde die Photosynthese von *Chlorella* durch $^1/_{100}$ molares rotes Blutlaugensalz stark gefördert, etwas weniger durch $^1/_{1000}$ mol. Bei $^1/_{10\,000}$ molarer Konzentration war die Assimilation normal (Abb. 7 II).

Die fördernde Wirkung des Ferrizyankaliums ist vielleicht dadurch zu erklären, daß in saurer Lösung Blausäure in geringen Konzentrationen abgespalten wird. Denn Gaffron (1939)

konnte zeigen, daß geringe HCN-Konzentrationen die Assimilation beschleunigen.

Die nächsten Untersuchungen wurden in alkalischer Lösung durchgeführt, weil das rote Blutlaugensalz an sich nur hierin die erforderlichen dehydrierenden Eigenschaften hat. Für die Versuche wurden die Algen in dem alkalischen Karbonat-Bikarbonat-Puffer nach Warburg suspendiert. In dieser Lösung beeinflußt selbst $^1/_{100}$ molares Ferrizyankalium die Assimilation kaum (Abb. 7 I).

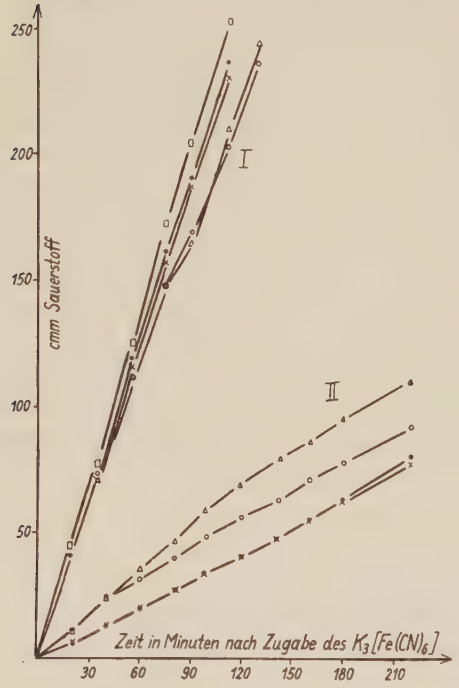

Abb. 7. Wirkung von rotem Blutlaugensalz auf die Assimilation von *Chlorella*. *Chlorella* ist I in alkalischem Puffergemisch (p_H-Wert = 9,2), II in Kulturlösung (p_H-Wert = 4,0) suspendiert. Das rote Blutlaugensalz befindet sich in Wasser gelöst im Anhang der Gefäße. Bei Zeit = 9 Min. wird die Lösung in die Algensuspension übertragen. Temperatur: 25°; Gas: in I Luft, in II Luft + 5% CO_2. •——• ohne, □——□ m/100 000, ×——× m/10 000, o——o m/1000, △——△ m/100 rotes Blutlaugensalz.

Im Zusammenhang mit dieser auffallend geringen Giftwirkung des Ferrizyankaliums ist es interessant, festzustellen, daß bei Wachstumsversuchen, die Pirschle (1935) mit *Aspergillus niger* durchführte, bereits eine $^1/_{1\,000\,000}$ molare Konzentration die Ausbildung des Mycels fast verhinderte.

b) In Stickstoff. *Chlorella* wurde in Natriumkarbonat - Bikarbonat-Puffer suspendiert und in den Hauptraum der Manometergefäße gefüllt, während sich in der Ansatzretorte in Wasser gelöst das rote Blutlaugensalz in unterschiedlichen Mengen befand. Nachdem die Algen entsprechend den Versuchen mit Chinon und Methylenblau im Dunkeln in Anaerobiose geschüttelt worden waren, wurde das Licht eingeschaltet.

Zwischen der von rotem Blutlaugensalz freien alkalischen Kontrollösung und derjenigen des Hauptversuchs ließ sich kein Wirkungsunterschied feststellen, d. h. die Entgiftung der sauren Gärungsprodukte durch Neutralisation mit Alkali setzte so rasch ein, daß eine etwa vorhandene Dehydrierung jener durch das rote Blutlaugensalz nicht erkennbar war.

Nebenbei bemerkt, war es dieser Versuch, der uns zuerst auf die Beziehungen zwischen p_H-Wert und Bedeutung des Luftsauerstoffs für das Wiederingangsetzen der Photosynthese nach Anaerobiose aufmerksam machte.

IV. Charakterisierung der Gärprodukte.

A. Allgemeines über Säurebildung und Säurewirkung.

Nachdem der Nachweis erbracht worden war, daß die Assimilationshemmung nach Anaerobiose durch Gärprodukte verursacht wird, die sauren Charakter besitzen und oxydierbar bzw. dehydrierbar sind, versuchten wir eine nähere Charakterisierung dieser Stoffe. Man kann mit Hilfe der manometrischen Methode ermitteln, wieweit die anaerobe Gärung der Algenzellen zu fixen Säuren führt und ob daneben Kohlendioxyd in einem der alkoholischen Hefegärung entsprechenden Vorgang in Freiheit gesetzt wird.

Chlorella und *Scenedesmus* wurden zu diesem Zwecke in einer Natriumbikarbonatlösung suspendiert, deren Konzentration so gehalten war, daß die Manometer ausreichten, den entstehenden Druck zu messen, wenn die gesamte Kohlensäure aus dem Bikarbonat in Freiheit gesetzt wurde. Die Algensuspension wurde in den Hauptraum der Manometergefäße gefüllt, in deren Ansatzretorte sich kristallisierte Zitronensäure befand, die nach der Anaerobiose der Suspension zugesetzt wurde. Die Luft wurde durch Stickstoff ersetzt. In den Kontrollsuspensionen wurde sofort nach dem Einleiten des Stickstoffs durch Zitronensäure die gesamte Kohlensäure aus dem Bikarbonat ausgetrieben und der entstehende Druck abgelesen. In den Versuchsgefäßen wurden die Algen während einer Nacht in Anaerobiose im Dunkeln im Thermostaten bei 25° geschüttelt.

Im ganzen sind drei Möglichkeiten der Druckentwicklung vorhanden: Wird in Anaerobiose nach Art der alkoholischen Gärung lediglich Gärungskohlensäure entwickelt, so beobachtet man während des Versuchs eine Druckentwicklung, ohne daß der Bikarbonatkohlensäuregehalt vermindert wird. Entsteht umgekehrt als Gärungsprodukt nur Säure, so muß der Bikarbonatgehalt am Schluß des Versuches um ebensoviel abgenommen haben, als Kohlensäure während der Anaerobiose ausgetrieben wurde. Verlaufen Säurebildung und alkoholische Gärung nebeneinander, so erhält man die Menge der Gärungskohlensäure aus der Differenz: (Restkohlensäure bei Versuchsende + CO_2 aus Druckentwicklung in Anaerobiose) — anfänglich bestimmte Gesamtkohlensäure, während sich die durch Säuren ausgetriebene Kohlensäure einfach aus der Differenz: Anfangsgehalt — Endgehalt an Bikarbonat ergibt.

Wir sehen aus Tab. 4, daß *Chlorella* in der Anaerobiose hauptsächlich Säuren bildet, während *Scenedesmus* überwiegend Kohlendioxyd und solche Stoffe produziert, die aus Bikarbonat

Tabelle 4.

Charakterisierung der Gärprodukte von *Chlorella* und *Scenedesmus*.

Suspensionslösung: Bikarbonat (0,092 g $NaHCO_3$ in 500 ccm Wasser gelöst). Jedes Gefäß enthält 5 ccm Algensuspension. Gas: N_2; Temperatur: 25° C.

Gesamtbikarbonat in cmm CO_2	Restbikarbonat nach Anaerobiose in cmm CO_2	Bei Gärung entwickelte CO_2 in cmm	CO_2 aus Säuregärung in cmm	Zusätzliche Gärungs-CO_2 in cmm
		Chlorella		
20,56	15,79	4,87	4,77	+ 0,10
	15,30	5,18	5,26	— 0,08
22,28	20,31	2,07	1,97	+ 0,10
22,05	19,39	2,85	2,66	+ 0,19
22,24	20,65	1,13	1,59	— 0,46
	21,19	1,05	1,05	± 0,00
		Scenedesmus		
23,30	22,97	1,97	+ 0,33	+ 1,64
23,30	23,57	1,95	— 0,27	+ 2,22
23,85	16,59	14,15	7,26	6,89
	17,28	14,04	6,17	7,87
28,17	24,32	4,77	1,18	3,59
	23,83	4,32	1,65	2,67

Tabelle 5.

Einfluß von Glukose auf Menge und Art in Anaerobiose entstehender Gärprodukte bei *Chlorella*.

Chlorella ist suspendiert in: 1. Bikarbonatlösung, 2. Bikarbonat + 2% Glukose (0,092 g $NaHCO_3$ in 500 ccm Wasser). Gas: N_2; Temperatur: 25°.

Gesamt-bikarbonat in cmm CO_2	Restbikarbonat nach Anaerobiose in cmm CO_2	Bei Gärung entwickelte CO_2 in cmm	CO_2 aus Säuregärung in cmm	Zusätzliche Gärungs-CO_2 in cmm
1. 21,78	20,65	1,60	1,13	+ 0,47
	20,05	1,55	1,73	— 0,18
2. 19,15	7,95	10,85	11,20	— 0,35

keine Kohlensäure frei machen. Immerhin zeigen die Versuche, daß auch *Scenedesmus* zur Säurebildung befähigt ist.

Mit derselben Versuchsanordnung wurde der Einfluß der Glukose auf die Menge und die Art der entstehenden Gärprodukte untersucht (Tab. 5). Bei *Chlorella* entstanden mit und ohne Glukose in der Anaerobiose fast nur Säuren, aber bei Glukosezusatz war die Säureproduktion etwa um das Achtfache erhöht. Auch Gaffron (1939) fand bei *Chlorella* in Gegenwart von Glukose einen starken Überschuß der Säuregärung über freie Gärungskohlensäure.

Obwohl die Hemmung der Photosynthese durch die Gärungsprodukte reversibel ist, wurde geprüft, ob in Anaerobiose eine Magnesiumabspaltung aus Chlorophyll durch die Gärungssäuren erfolgt.

Die Chlorellen wurden suspendiert in:

a) saurer Kulturlösung,

b) saurer Kulturlösung + 1% Glukose,

c) alkalischem Karbonat-Bikarbonat-Puffer und 20 Std. lang unter Stickstoff im Dunkeln gehalten. Nach Beendigung der Anaerobiose wurden die Algen abzentrifugiert, das Chlorophyll mit Methylalkohol extrahiert und spektroskopisch auf das Vorhandensein von Phaeophytin geprüft. In allen Fällen war das Chlorophyll unverändert. Die Assimilationshemmung kann also nicht auf einer Magnesiumabspaltung aus Chlorophyll infolge Säurebildung in der Anaerobiose beruhen.

B. Versuch einer Identifizierung der Gärprodukte.

Chlorella und *Scenedesmus* wurden in großen Mengen herangezüchtet. Durch Zentrifugieren wurden dichte Suspensionen in etwa 0,2proz. Natriumbikarbonatlösung hergestellt und in Hessekolben gebracht. Durch längeres Einleiten von reinstem Stickstoff wurde die Luft aus den Kolben verdrängt. Nach 17- bis 20stündiger Anaerobiose im Dunkeln bei Zimmertemperatur wurde die Suspensionsflüssigkeit rasch abzentrifugiert und ein Teil unverändert untersucht. Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde vor der Untersuchung auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen eingeengt.

Geprüft wurde auf das Vorhandensein von Milchsäure, Essigsäure, Brenztraubensäure, Fumarsäure und Äpfelsäure.

Für die Milchsäurebestimmung wurde die von Mendel und Goldscheider (1925) beschriebene Methode verwendet, bei der Milchsäure durch konzentrierte Schwefelsäure zu Acetaldehyd oxydiert wird, der mit Veratrol eine Rotfärbung gibt, welche zur kolorimetrischen Bestimmung geeignet sein soll. Kohlenhydrate stören die Reaktion und wurden zuvor mit Kalziumoxyd und Kupfersulfat entfernt. Die Genauigkeit der Methode, die nicht sehr groß ist, reichte für unsere Messungen aus.

Die von *Chlorella* nach Anaerobiose abzentrifugierte Flüssigkeit und ebenso ihr Eindampfrückstand färbten sich, nachdem mit α-Naphthol und Schwefelsäure Kohlehydrat nicht mehr nachzuweisen war, mit Veratrol rot, wenn die Lösung gemäß der Vorschrift vorher mit Schwefelsäure erhitzt wurde. Ohne vorangehendes Erwärmen war niemals eine Färbung mit Veratrol zu beobachten; das bedeutet, daß Acetaldehyd in der Versuchslösung nicht vorhanden war. Außerdem ergab eine Fällung mit Zinknitrat, die auf dem Objektträger unter dem Mikroskop ausgeführt wurde, Kristalle, von Eigenschaften und Aussehen des Zinklaktats[1]. Auch eine Probe auf Milchsäure mit 1proz. Karbolsäurelösung fiel positiv aus. Die Suspensionslösung von *Chlorella* enthielt demnach nach Anaerobiose offenbar Milchsäure.

[1]) Herrn Dr. Menke danke ich für freundliche Hilfe beim Identifizieren des Zinklaktats.

Es wurde versucht, bei *Chlorella* eine Beziehung zwischen Milchsäuremenge und Trockengewicht herzustellen. Die sehr zahlreichen Versuche ließen jedoch keinen Zusammenhang erkennen.

Solange die Algen abzentrifugiert und von einem Gefäß in ein anderes gebracht werden, besteht die Möglichkeit, daß milchsäurebildende Bakterien in die Algensuspension gelangen können. Um dies zu verhindern, wurde *Chlorella* in der Anzuchtlösung untersucht. Da die Nitrationen der üblichen Nährlösung die Veratrolreaktion stören, wurde *Chlorella* für diesen Versuch in Ammonsalzkultur herangezogen. Es wurden geschlossene Kulturkolben verwandt, in denen später die Luft durch Stickstoff ersetzt werden konnte. Sobald die Kulturen grün waren, wurden sie ohne vorheriges Zentrifugieren und ohne die Gefäße zu öffnen, in Anaerobiose gebracht. Nach 20 Std. wurde die Suspensionsflüssigkeit rasch abzentrifugiert und ein kleiner Teil unverändert auf die obengenannten Säuren untersucht. Der Hauptteil wurde mit einer gesättigten Lösung von Natriumbikarbonat genau neutralisiert. Um die Pufferung der Nährlösung aufzuheben, waren erhebliche Mengen Bikarbonat erforderlich. Aber auch unter diesen Bedingungen waren die obengenannten Reaktionen auf Milchsäure positiv. Selbstverständlich wurde durch mikroskopische Untersuchung die Abwesenheit jeglicher Bakterien sichergestellt.

Alle anderen Säuren konnten in der Suspensionsflüssigkeit von *Chlorella* nach Anaerobiose nicht gefunden werden. Essigsäure wurde als Natriumuranylacetat, Brenztraubensäure mit Phenylhydrazin, Fumarsäure als Natriumuranylsalz und Äpfelsäure mit der Schwefelsäure-Resorzinreaktion zu erfassen gesucht. Essigsäurebildung, wie sie Ruhland und Ramshorn (1938) in meristematischen Geweben feststellten, kann bei den Algen in Anaerobiose nicht erwartet werden, da kaum anzunehmen ist, daß bei Sauerstoffmangel eine Teilung der Algenzellen stattfindet. Auch wurde niemals Acetaldehyd gefunden.

Bei *Scenedesmus* fielen sämtliche Reaktionen auf Säuren, also im Gegensatz zu *Chlorella* auch die auf Milchsäure, negativ aus. Damit steht im Einklang, daß gemäß den manometrischen Untersuchungen *Chlorella* in Anaerobiose als Gärprodukt überwiegend

Säure bildet, während die Säurebildung des untersuchten *Scenedesmus*-Stammes gegenüber der Kohlensäurebildung meist stark zurückblieb.

Somit wäre es denkbar, daß sich die beiden Algen in ihrem karboxylatischen System unterscheiden. In orientierenden Manometerversuchen, zu denen bei Raumtemperatur im Hochvakuum rasch getrocknetes Algenpulver unter Zusatz von Hefekochsaft [Wetzel (1932)] verwandt wurde, ergab sich jedoch sowohl bei *Chlorella* als auch bei *Scenedesmus* eine erhebliche karboxylatische Wirksamkeit, die sich größenordnungsmäßig nicht von derjenigen in Blattpulver unterschied. (Die in einer vorläufigen Mitteilung [Naturwiss. 1939. **27**, 645] gemachte Angabe einer minimalen Karboxylasewirkung bei *Chlorella* beruht auf einem Irrtum, da früher der notwendige Zusatz von Hefekochsaft unterblieben war, worauf uns Herr Prof. Wetzel aufmerksam machte.)

C. Versuche zur Identifizierung der assimilationshemmenden Gärungssäure.

Zu diesem Zweck wurde die Wirkung eines Zusatzes von Milchsäure auf die Photosynthese bei Luftgegenwart geprüft. Der Erfolg war bei *Chlorella* und *Scenedesmus* verschieden.

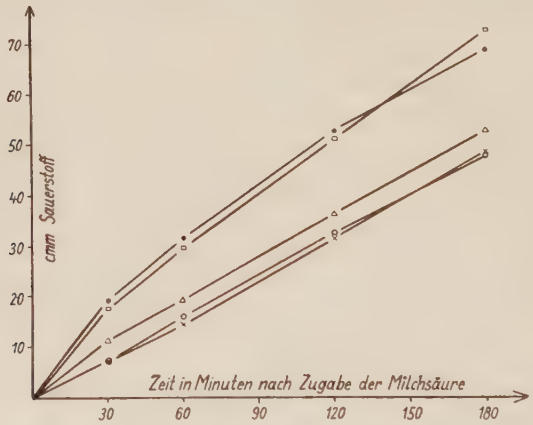

Abb. 8. Wirkung von Milchsäure auf die Assimilation von *Scenedesmus*. *Scenedesmus* ist in Kulturlösung suspendiert. In den Gefäßanhängen befindet sich die Milchsäure mit Wasser verdünnt und wird bei Zeit = o Min. in die Algensuspension übergeführt.
Temperatur: 25°; Gas: Luft + 5% CO_2. o—o ohne, ×—× m/100 000, △—△ m/10 000, □—□ m/1000, ·—· m/100 Milchsäure.

Die Photosynthese von *Scenedesmus*, d. h. des hier verwandten Stammes, wurde im Gegensatz zum Verhalten von *Chlorella* durch $^1/_{100}$ mol Milchsäure nicht nur nicht gehemmt, sondern stark gesteigert (Abb. 8). Dasselbe unterschiedliche Verhalten war gegenüber $^1/_{100}$ mol Brenztraubensäure zu beobachten.

Obwohl demnach schon aus diesem Grunde, der später noch durch andere ergänzt werden wird, die Milchsäure nicht gut für die Hemmung der Photosynthese verantwortlich gemacht wer-

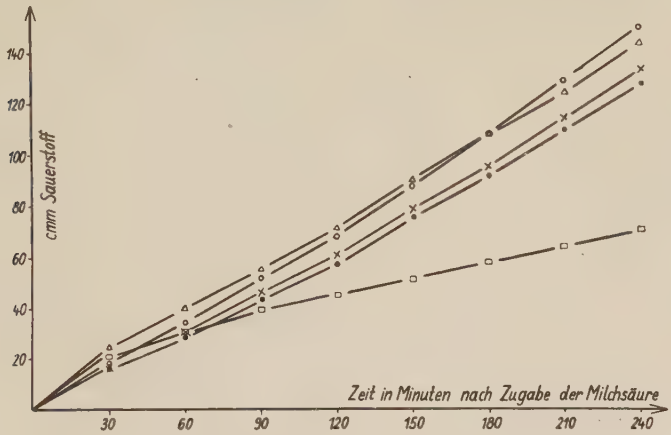

Abb. 9. Wirkung von Milchsäure auf die Assimilation von *Chlorella*. *Chlorella* ist in Kulturlösung suspendiert. In den Ansatzretorten befindet sich die Milchsäure mit Wasser verdünnt in Konzentrationen, die den Inhalt des Hauptraumes auf die gewünschte Milchsäurekonzentration bringen. Bei Zeit = o Min. wird die Milchsäure in den Hauptraum gekippt.
Temperatur: 25°; Gas: Luft + 5% CO_2. •—• ohne, ×—× m/100 000, o—o m/10 000, △—△ m/1000, □—□ m/100 Milchsäure.

den kann, wurde doch zur Orientierung ihre Wirkung auf die Assimilation von *Chlorella* in Mengen von $^1/_{100}$ mol bis $^1/_{100\,000}$ mol geprüft (Abb. 9):

Milchsäurekonzentrationen bis herauf zu $^1/_{1000}$ mol steigern die Assimilation nicht wesentlich; bei $^1/_{100}$ mol tritt eine mit der Versuchszeit zunehmende Schädigung ein. Nach 90 Minuten hat die Photosynthese einen geringen aber konstanten Wert erreicht. Natriumlaktat, das bei der Aufhebung der Assimilationshemmung durch Neutralisation entstehen muß, beeinflußt dagegen selbst bei $^1/_{100}$ molarer Konzentration die Photosynthese nicht (vgl. auch Tang [1937)].

Vergleichen wir nun die zur Assimilationshemmung notwendige Menge zugesetzter Milchsäure mit der Säuremenge, die bei Bildung in Anaerobiose zur Assimilationshemmung führt, so ergibt sich ein sehr großer Unterschied. Während z. B. 0,0045 g zugesetzter Milchsäure auf 5 ccm *Chlorella*-Suspension die Photosynthese erniedrigen, wird sie durch 0,0000042 g in Anaerobiose entstandener Säure, bezogen auf Milchsäure, völlig verhindert. (Dieser Wert wurde errechnet aus der zur Neutralisation der Gärprodukte notwendigen Menge Bikarbonat.) Wenn die gebildete Säure stärker wirksam ist als die von außen zugeführte, so läßt sich dies u. a. darauf zurückführen, daß die Gärungssäure am Ort der Entstehung angereichert und nicht von der Zelle ins Medium abgegeben wird, und daß umgekehrt die von außen zugeführte Säure nur schwer in die Zelle einzudringen vermag. Ferner wäre es möglich, daß die Bedingungen der Anaerobiose die Zellen schon gegen geringe Säuremengen empfindlich machen. Trifft dies zu, so muß ein Zusatz von Milchsäure nach mäßig langem Sauerstoffentzug die Zellen stärker schädigen, als es in Gegenwart von Luft der Fall ist. Abb. 10 zeigt tatsächlich, daß $^1/_{100}$ molare Säure nach mäßig langer Anaerobiose die Assimilation völlig hemmt und $^1/_{1000}$ molare

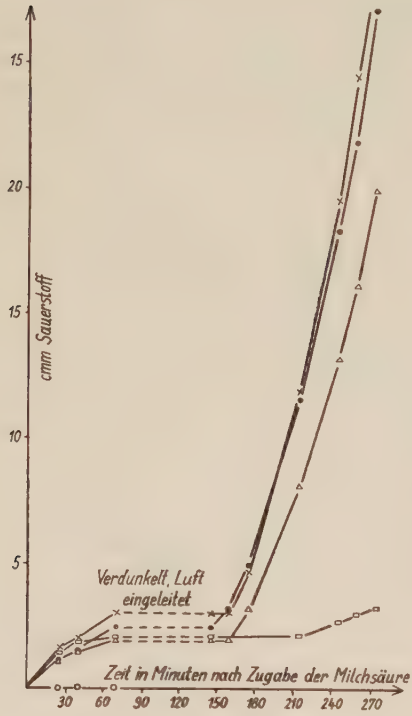

Abb. 10. Wirkung von Milchsäure auf die Assimilation von *Chlorella* nach 9 Std. Anaerobiose im Dunkeln. *Chlorella* ist in Kulturlösung suspendiert. In den Ansatzretorten befindet sich die Milchsäure verdünnt mit Wasser. Bei Zeit = 0 Min. wird die Milchsäure in den Hauptraum übergeführt.

Temperatur: 25°; Gas: Stickstoff + CO_2; nach 70 Min. wird Luft + CO_2 eingeleitet. •—• ohne, ×—× m/100 000, △—△ m/10 000, □—□ m/1000, o—o m/100 Milchsäure.

Konzentration stark schädigt, also Säuremengen, die in Luft die Photosynthese nur teilweise bzw. gar nicht beeinflussen. Man wird also in Rechnung zu setzen haben, daß die Anaerobiose eine Erhöhung der Säureempfindlichkeit von *Chlorella* mit sich bringt.

Besprechung der Ergebnisse.

Die Arbeit zeigt, daß Theorien, die eine Beteiligung des Luftsauerstoffs an den Initialvorgängen der Photosynthese fordern, nicht auf der Erscheinung der Assimilationshemmung durch Sauerstoffentzug aufgebaut werden können. Denn diese Assimilationshemmung ist keine spezifische Folge des Sauerstoffentzugs, sondern bedingt durch die Anhäufung eines hemmend wirkenden Gärprodukts, das während der der Assimilation vorangehenden Anaerobiose entsteht. Dieses Gärprodukt hat Säurecharakter, da nach Neutralisation der sauren Kulturmedien kurz vor der Belichtung oder beim Ansetzen der Kulturen in Bikarbonat-Puffergemischen die Assimilationshemmung ausbleibt. Diese Säure ist außerordentlich leicht oxydabel, da Luftzufuhr nach Anaerobiose die Assimilationshemmung sehr rasch beseitigt. Hierbei wirkt der Luftsauerstoff dehydrierend, da er durch Chinon ersetzt werden kann.

Die Identifizierung der wirksamen Säure ist nicht gelungen. Allerdings wurde zweifelsfrei bei *Chlorella* das Auftreten von Milchsäure als Gärprodukt sichergestellt. Jedoch ist deren Gleichsetzung mit dem assimilationshemmenden Prinzip aus folgenden Gründen zunächst nicht wahrscheinlich.

Zum ersten wurde bei dem untersuchten *Scenedesmus*-Stamm im Gegensatz zu *Chlorella* keine Milchsäure gefunden, wie denn überhaupt bei jenem nur selten eine Säure auftrat, die aus Bikarbonat Kohlendioxyd austreibt, obwohl auch hier Bikarbonat-Puffer die Hemmung der Photosynthese regelmäßig aufhebt, und zwar auch, wenn das Alkali erst nach Anaerobiose in saurem Medium zugesetzt wird.

Zum zweiten bietet die für die Assimilationshemmung verantwortlich zu machende Säure eine Besonderheit in ihrer stark ausgeprägten Oxydationsfähigkeit.

Zum dritten ist daran zu erinnern, daß bei längerer Anaero-

biose unter Umständen die Hemmung der Photosynthese nur noch durch Alkali und nicht mehr durch Luftsauerstoff beseitigt werden kann, also, wie schon früher erwähnt, vielleicht eine besonders aktive Vorstufe den eigentlichen Hemmungsfaktor darstellt.

Viertens gelang es nicht, Milchsäure durch Chinon, das die Assimilationshemmung in allen Fällen glatt beseitigte, in vitro zu dehydrieren. Weder mit Phenylhydrazin, noch mit Nitroprussidnatrium oder α-naphthol konnte Brenztraubensäure gefaßt werden. Natürlich ist an sich die Möglichkeit zu einer Reaktion zwischen Chinon und Milchsäure in Gegenwart lebender Zellen nicht ausgeschlossen.

Fünftens steigert Milchsäurezusatz die Photosynthese von *Scenedesmus* in einer Weise, die ein Unwirksamwerden der Milchsäure infolge oxydativer Zerstörung ausschließt.

Sechstens wirkt sich ein Zusatz von Milchsäure zu *Chlorella* und *Scenedesmus* verschieden aus.

Andererseits wäre es natürlich möglich, daß bei beiden Algen die Hemmung der Photosynthese lediglich durch die intrazellular vorhandene Milchsäure bestimmt wird und eben nur bei *Chlorella* ein regelmäßiger Austritt der Milchsäure ins Kulturmedium erfolgt. Hiermit ließe sich die Tatsache vereinbaren, daß bei *Scenedesmus* die Assimilationshemmung bei Alkalizusatz ausbleibt, ohne daß in Anaerobiose aus Bikarbonat Kohlensäure freigemacht wird. Voraussetzung dabei ist natürlich, daß beide Algen Permeabilität für Alkali besitzen. Auch ist daran zu erinnern, daß nach Anaerobiose *Chlorella* weit empfindlicher gegen Milchsäure ist als in Luft.

Aber ebensogut kann es sich um ein unbekanntes, in beiden Algen gleichmäßig vorkommendes, schwachsaures Prinzip handeln und dies erscheint in Anbetracht der auffallend starken Oxydationsfähigkeit dieses Prinzips zunächst als das Wahrscheinlichere.

Erschwert wird die Frage durch die von Gaffron nachgewiesene physiologische Verschiedenheit auch naheverwandter Stämme. Auch beschreibt er einen *Scenedesmus*-Stamm, der im Gegensatz zu dem hier untersuchten in Anaerobiose ohne Glukose 75% seiner Gärprodukte als organische Säure ausscheidet.

Unterschiede zwischen *Chlorella* und *Scenedesmus* fanden sich ja auch im Verhalten gegen zugesetzte Milchsäure, indem die Photosynthese von *Scenedesmus* durch mol/100 Milchsäure stark gesteigert wurde, während dieselbe Konzentration die Assimilation von *Chlorella* stark hemmte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Steigerung der Photosynthese durch Milchsäure bei *Scenedesmus* in Gegenwart von Sauerstoff in einem gewissen Zusammenhang zu einem Befund von Gaffron (1937) steht, wonach die Photosynthese von *Scenedesmus* in Stickstoff nach vorhergehender 3—10stündiger Anaerobiose im Dunkeln in den ersten Minuten weit über der normalen Leistung liegt. Er erklärt dies damit, daß Sauerstoff eine die Photosynthese hemmende Oxydation eines Katalysators bewirkt, die in Stickstoff wegfällt. Der von uns gefundene Stimulationseffekt von Milchsäure bei Sauerstoffgegenwart läßt jedoch auch die Möglichkeit zu, daß bei den Versuchen Gaffrons im Dunkeln sich in Stickstoff Milchsäure gebildet hat, die auf die darauf ebenfalls in Stickstoff folgende Photosynthese stimulierend wirkte, um so mehr als Gaffron besonders starke Effekte in Gegenwart von Glukose erhielt. Immerhin lassen die von den unsrigen zeitlich verschiedenen Versuchsbedingungen Gaffrons wie auch die Tatsache, daß Gaffron keine genauen Angaben über die p_H-Bedingungen bei seinen Versuchen macht, keine Entscheidung zu. Andererseits ist aber darauf hinzuweisen, daß Gaffron *Chlorella* zum Nachweis der übernormalen Assimilation nicht geeignet fand, da bei ihr fast immer eine verlängerte Induktion bei Beginn der Photosynthese auftrat. Dies könnte mit dem von uns bei *Chlorella* festgestellten Ausbleiben einer Assimilationssteigerung nach Milchsäurezusatz zusammenhängen.

Zusammenfassung.

Der Anlauf der Photosynthese von *Chlorella* und *Scenedesmus* kann durch Sauerstoffentzug in reversibler Weise gehemmt werden. Jedoch ist diese Hemmung keine spezifische Wirkung des Sauerstoffentzugs. Denn sie tritt nur im sauren Kulturmedium auf, während im alkalischen die Photosynthese auch nach 12- bis 17stündiger Anaerobiose im Dunkeln bei folgender Belichtung in normaler Weise einsetzt. Somit kann in dem Ausbleiben

der Photosynthese bei Sauerstoffentzug kein Beweis für die Beteiligung des Sauerstoffs an den Initialvorgängen der Photosynthese gesehen werden.

Die Assimilationshemmung bleibt bei beiden Algen auch im sauren Medium aus, wofern der Kulturflüssigkeit unmittelbar vor der Belichtung Bikarbonat zugesetzt wird. Somit ist das im sauren Medium entstehende, assimilationshemmende Prinzip eine Gärungssäure.

Die Assimilationshemmung im sauren Medium bleibt auch aus, wenn nach der Anaerobiose im Dunkeln und darauffolgender Belichtung Sauerstoff zugeführt wird. Dabei verschwindet Sauerstoff. Somit ist die assimilationshemmende Gärungssäure sehr leicht oxydabel.

Der Luftsauerstoff kann, nur untersucht bei *Chlorella*, durch Chinon ersetzt werden. Somit besteht die Oxydation der Gärungssäure in einer Dehydrierung. Methylenblau ist wirkungslos, ebenso rotes Blutlaugensalz in alkalischer Lösung. Rotes Blutlaugensalz in saurer Lösung steigert sogar in der hohen Konzentration von $^1/_{100}$ mol die Photosynthese beträchtlich, vermutlich infolge Abspaltung von Blausäure, die stimulierend wirken kann.

Chlorella bildet in Anaerobiose Säuren, die aus Bikarbonat Kohlendioxyd frei machen, während der untersuchte *Scenedesmus*-Stamm nur in seltenen Fällen fixe Säuren, sondern statt dessen meist Kohlensäure bildete.

In den Kulturflüssigkeiten von *Chlorella* konnte Milchsäure nachgewiesen werden, während bei *Scenedesmus* keine Säure erfaßt wurde.

Die Ursache der Assimilationshemmung dürfte nicht auf Milchsäure, sondern auf ein sehr schwachsaures und auffallend leicht oxydables Gärungsprodukt zurückzuführen sein, wofern man nicht der nicht erfaßbaren intrazellular vorhandenen Milchsäure diese Funktion zuerkennt.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1934 bis Mai 1936 und November 1937 bis September 1939 im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Berlin mit

dankenswerter Unterstützung des Forschungsdienstes angefertigt. Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Noack, danke ich für die Anregung zu der Arbeit und für die stete Förderung. Auch Herrn Dr. A. Pirson bin ich für wertvolle Hinweise zu Dank verpflichtet.

Schrifttum.

Blinks, L. R. and Skow, R. K., The time course of photosynthesis as shown by a rapid elektrode method for oxygen. Proc. National. Acad. Sciences. 1938. **24,** 420.

Emerson, R., Photosynthesis. Ann. Review of Biochemistry. 1937. **6,** 535.

Franck, J., Beitrag zum Problem der Kohlensäureassimilation. Naturwiss. 1935. **23,** 226.

Gaffron, H., Inwiefern ist Sauerstoff für die Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen unentbehrlich? Naturwiss. 1935. **23,** 528.

—, Über die Unabhängigkeit der Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen von der Anwesenheit kleiner Sauerstoffmengen und über eine reversible Hemmung der Assimilation durch Kohlenoxyd. Biochem. Zeitschr. 1935. **280,** 337.

—, Das Wesen der Induktion bei der Kohlensäureassimilation grüner Algen. Naturwiss. 1937. **25,** 715.

—, Eine Erklärung der Induktion bei der Assimilation der Kohlensäure. Naturwiss. 1937. **25,** 460.

—, Über Anomalien des Atmungsquotienten von Algen aus Zuckerkulturen. Biol. Zbl. 1939. **59,** 288.

—, Über auffallende Unterschiede in der Physiologie nahe verwandter Algenstämme, nebst Bemerkungen über „Lichtatmung". Biol. Zbl. 1939. **59,** 302.

Genevois, L., Über Atmung und Gärung in grünen Pflanzen. Biochem. Zeitschr. 1927. **186,** 461.

Kautsky, H., und Hormuth, R., Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. VII. Ebenda. 1937. **291,** 285.

Kautsky, H. und Eberlein, R., Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. VIII. Ebenda. 1939. **302,** 137.

Mendel, B. und Goldscheider, J., Eine kolorimetrische Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure im Blut. Ebenda. 1925. **164,** 163.

Noack, Kurt, Photochemische Wirkungen des Chlorophylls und ihre Bedeutung für die Kohlensäureassimilation. Zeitschr. f. Bot. 1925. **17,** 481.

Pirschle, K., Weitere Untersuchungen über die vergleichsweise Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit *Aspergillus niger* (Stimulation und Toxizität). Planta. 1935. **24,** 649.

Rabinowitch, E. and Weiss, J., Reversible oxydation of chlorophyll. Proc. Roy. Soc. A. 1937. **162,** 251.

Ruhland, W. und Ramshorn, K., Aerobe Gärung in aktiven pflanzlichen Meristemen. Planta. 1938. **28,** 471.

Stoll, A., Zusammenhänge zwischen der Chemie des Chlorophylls und seiner Funktion in der Photosynthese. Naturwiss. 1936. **24,** 53.

Tang, P. S., Studies on the Kinetics of cell respiration. Journ. Cellular a. comparative Physiology. 1937. **10,** 499.

Warburg, O., Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. Berlin 1928.

Wassink, E. C., Vermeulen, D., Reman und Katz, E., On the relation between fluorescence and assimilation in photosynthezing cells. Enzymologia. 1938. **5,** 100.

Wetzel, K., Beiträge zur Kinetik der Carboxylase und ihre Bedeutung für die Steuerung des biologischen Kohlehydratabbaues. Planta. 1932. **15,** 697.

—, Das carboxylatische System im grünen Blatt. Ebenda. 1932. **17,** 1.

—, Zur Physiologie der anaeroben Atmung höherer Pflanzen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 1933. **51,** 46.

—, Die chemischen Vorgänge beim biologischen Kohlehydratabbau. Erg. d. Biol. I. Teil. 1931. **7,** 404. II. Teil. 1934. **10,** 323.

Willstätter, R. und Stoll, A., Über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1918.

Willstätter, R., Zur Erklärung der Photoreduktion von Kohlensäure durch Chlorophyll. Naturwiss. 1933. **21,** 252.

Lebenslauf.

Ich wurde am 1. Dezember 1909 als Tochter des Gewerbeassessors Wilhelm Michels und seiner Ehefrau Johanna geb. König, in Trier geboren. Nach Ablegung der Reifeprüfung an der Viktoria-Luise-Schule (Oberlyzeum der Oberrealschulrichtung), studierte ich von 1931 bis 1936 an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin Naturwissenschaften, insbesondere Biologie und Chemie. Von 1936 bis Herbst 1937 habe ich mein Studium unterbrochen. Von 1937 bis 1939 beendete ich meine Dissertationsarbeit.

Hedwig Michels.

Buchdruckerei F. Mitzlaff, Rudolstadt/Thür.